(B2) 퐾 4 盐 华 2 (19) 日本日本日(1 b)

**特許第3329819号** (P3329819)

(11)格字格中

(24) 登録日 平成14年7月19日(2002.7.19) ZNAA 8 15/00 2/00 AOIH C12N (45)発行日 平成14年9月30日(2002.9.30) 4月1日中 ZNA 1/00/2 C12N 15/09

C12N A 0 1 H (51) Int.Cl.

耐水項の数34(全 22 耳)

(21) 田岡勝寺	特里平7—508037	(73) 传养指者	(73) 徐許福者 889998999
:			日本たばて産業株式会社
(86) (22) (11)	平成6年9月1日(1994.9.1)		東京都港区虎ノ門2丁肖2番1号
		(72) 発明者	拉爾 龙母
(86)日際出版等中	PCT/JP94/01442		静岡県磐田郡豊田町東原700 日本たば
(87)因数公開番号	WO95/06722		<b>ご産業株式会社遺伝育権研究所内</b>
(87)国际公园日	平成7年3月9日(1995.3.9)	(72)発明者	石田 格二
田长鶴安安	平成10年3月3日(1998.3.3)		静岡県磐田郡豊田町東原700 日本たば
(31) 優先權士敬母時	<b>存置平5-243975</b>		こ産業株式会社遺伝省超研究所内
(32)優先日	平成5年9月3日(1933.9.3)	(72) 発明者	<b>福江井 枯弘</b>
(33) 優先相主政団	日本(JP)		<b>砂料県磐田都豊田町東原700 日本たば</b>
(31)優先権主張番号	<b>特閣平</b> 6-27320		八萬葉株式会社遺伝資循研究所內
(32) 優先日	平成6年1月31日(1994.1.31)	(72) 発明者	小 個 長 段
(33) 優先権主張国	日本 (JP)		<b>静岡県磐田郡豊田町東原700 日本たば</b>
			に産業株式会社書伝育権研究所内
		(74)代理人	666666666
			弁理士 谷川 英次郎
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 未納胚の胚盤を用いた単子葉植物の形質転換方法

「請求項1]所望の遺伝子を含有するアグロバクテリウ ム価細菌で単子薬植物の鵜分化処理していない未熟胚の **胚盤を形質転換し、形質転換体を得ることからなる、単** 子集植物の形質転換方法。 (37) 【特許器状の範囲】

【精求項2】アグロバクテリウム属細菌で単子葉植物の 税分化処理していない未効胚を形質転換し、形質転換体 を得るにあたり、数米熱胚の形質転換が数アグロバクテ 【請求項3】アグロバクテリウム属細菌で単子葉植物の **梲分化処理していない未熟胚を形質転換し、形質転換体** リウム隅細菌と酸未熱胚とを共存培養することからな 5、請求項1記載の単子集値物の形質転換方法。

【請求項4】数共存培費が個体培地上であることを特徴 とする静求項2または3のいずれか1項記載の単子業値 の単子繁植物の形質転換方法 物の形質転換方法。

体を得ることからなる請求項1乃至4のいずれか1項記 「請求項5」所望の遺伝子を含有し、かつTiまたはRiプ ラスミドを持つアグロバクテリウム属細菌で単子葉植物 の脱分化処理していない未熟胚を形質転換し、形質転換 銀の単子葉植物の形質転換方法。

【請求項6】数TiまたはRiブラスミドが始展原性アグロ パクテリウム由来のものである請求項 1 乃至5のいずれ か1項記載の単子菜植物の形質転換方法。 97

【請求項7】数アグロバクテリウム属細菌が強病原性ア グロバクテリウムに含まれるTiまたはRiブラスミドのヴ 4ルレンス領域由来のONA領域を含む耐水項1乃至6の

リウム質細菌と蔵未熱胚とを接触させた後、共存培養す 5ことからなる、耐水項1または2のいずれか1項配載 を仰るにあたり、数未禁配の形質転換が波アグロバクテ

**特許3329819** 

NIブラスミドと所望の遺伝子を含有するブラスミドが異 なる請求項13乃至17のいずれか!項記載の単子禁植物の

【翻求収8】数アグロバクテリウム属細菌がTiまたはRi

いずれか1項記載の単子集植物の形質転換方法。

ブラスミドを持つアグロバクテリウム植倒であって、さ

らに強病原性アグロバクテリウムのTiまたはRiブラスミ

【語求項18】数アグロバクテリウム頃組営が所知の過 **伝子を含有するブラスミド上に強減原性アグロバクチリ ウムのTiまたはRiブラスミドのヴィルレンス領域由来の** DNA析片を含む耐水切13万至18のいずれか1 収配扱の単 子禁植物の形質転換方法。 【請求項20】数アグロバクテリウムに含まれる下また アグロバクテリウム ツメファシエンス (Agrobacteriu m Tumefactons) A281のTiブラスミドpTiBo542のヴィル レンス領域由来のDNA領域である請求項13乃至19のいず はRiプラスミドのヴィルレンス領域由来のDNA所片が、 れか1項記載の単子禁値物の形質転換方法。 2

る請求項1乃至8のいずれか1項記載の単子葉植物の形

「静水項10】数アグロバクテリウム属細菌が所望の遺 **伝子を含有するプラスミド上に強病原性アグロバクテリ**  ウムのTiまたはRiプラスミドのヴィルレンス領域由来の

DNA断片を含む静水瓜I 乃至9のいずれか I 項記載の単

「静水項9」数アグロバクテリウム属価額が下またはR1 プラスミドと所型の遺伝子を含有するブラスミドが異な

を導入した糖求項1乃至7のいずれか1項配載の単子葉

植物の形質転換方法。

ドのヴィルレンス領域由来のDNA領域を含むブラスミド

なくともVin及びVincを含む倒域である間求項13乃至20 【静水項22】 放共存培養と散分化処理を同時に行なう 【群状斑21】数グィルレンス競戏由来のINV配扱が少 のいずれかし項記載の単子供植物の形質転換方法

ことを特徴とする耕求項13乃至21のいずれか1項配載の

単子薬植物の形質転換方法。

2

アグロバクテリウム ツメファシエンス (Agrobacteriu

はRiプラスミドのヴィルレンス短返由来のDNV断片が、

m Tumefacions)A281のTiブラスミドpTiBo542のヴィル

レンス領域由来のDAA領域である請求項1乃至10のいず 【指求項12】 数グィルレンス領域由来のDNA領域が少

hか1項記載の単子葉植物の形質転換方法。

【請求項11】 酸アグロバクテリウムに含まれるTiまた

子葉植物の形質転換方法。

【請求項23】 敵未熱胚との接触するアグロバクテリウ 4層相類の協談度が10~10′組貨/m)であることを特徴 とする、館求項1乃至22のいずれか1項記載の単子禁植 物の形質転換方法。

なくともいる及びいんを含む領域である請求項1乃至1

【請求項13】アグロバクテリウム属相関で単子禁値物 の脱分化処理していない未熟胚を形質転換し、形質転換 テリウム両細菌と該未熱胚との接触時以降、脱分化処理

のいずれか1項記載の単子集植物の形質転換方法。

ム属細菌との接触が、数アグロバクテリウム属細菌の懸 数数数液中の磁液度が10~101. 無路/miであることを特 徴とする、請求項1乃至23のいずれか1項記載の単子線 [請求項24] 数未熱胚と復独する数アグロバクテリウ **関液中に散水熱胚を投消することにより行ない、かつ、** 

【讃水項25】数未熱胚が、僻紫処理や付傷などの前処 理が行われていない米熱胚である糖求項1乃至24のいず れか!項記載の単子葉植物の形質転換方法。 細胞の形質転換方法。

することをさらに含む、訥水項1ないし12のいずわか1

項に記載の単子葉植物の形質転換方法。

体を得るにあたり、酸末熱胚の形質転換が酸アグロバク

【翻求項14】所望の遺伝子を含有し、かつTiまたはRi

ブラスミドを持つアグロバクテリウム属細菌で単子葉植 物の脱分化処理していない未熟胚を形質転換し、形質転

段体を得ることからなる請求項13または14のいずれか1

項記載の単子葉植物の形質転換方法。

【請求項26】数未熱胚が、受物後2日目以降の未熟胚 Cあることを特徴とする、請求項1乃至2sのいずわか1

する謝末項1乃至26のいずれか1項記載の単子葉植物の 【請求項27】数未熱胚が、正常な個体を再生する能力 を有するカルスを誘導できる未熟胚であることを特徴と 項記載の単子葉植物の形質転換方法。

せ、脱分化状骸にて形質転換細胞の選抜、増殖を行ない 形質転換体を得ることを特徴とする糖水項1乃至27のい 【請求項28】形質転換後、形質転換細胞を貼分化さ ずれか!項記載の単子萊植物の形質転換方法。 40 形型転換方法。

【請求項16】数アグロバクテリウム属相関が強成原性

hか1項記載の単子葉植物の形質転換方法。

アグロバクテリウムに含まれる下またはRiブラスミドの

ヴィルレンス領域由来のDNA領域を含む請求項13乃至15

のいずれか1項記載の単子葉植物の形質転換方法。

【請求項17】 酸アグロバクテリウム属相菌が下または さらに強病原性アグロバクテリウムのTiまたはRiプラス

タイブラスミドを持つアグロバクテリウム細菌であって

【請求項15】数TiまたはRiプラスミドが強病原性アグ ロバクテリウム由来のものである해求項13乃至14のいず 【請求項29】数未熱胚を形質転換するアグロバクテリ ウム属笛窗が、アグロバクテリウム ツメンァンドンス る請求項1乃至28のいずれか1項記扱の単子禁植物の形 (Agrobacterium Tumefaciens) であることを特徴とす

【請求項30】 敵未熱胚が未熱胚の胚盤であることを特

8

「静水項18] 敢アグロバクテリウム原細菌がTiまたは

ドを導入した請求項13乃至16のいずれか1項記載の単子

ミドのヴィルレンス領域由来のDAA領域を含むブラスミ

3

致とする静水項!乃至29のいずれか!項記載の単子業値 効の形質転換方法。 【部氷項31】数単子森植物がネネ目とを 特徴とする語米項1乃至30のいずれか | 項記載の単子薬 植物の形質転数方法。 「翻収項32」数イネ料値物がイネまたはトウモロコシ であることを特徴とする請求項1乃至3のいずれか1項 記載の単子葉植物の形質転換方法。

【謝来項3】 数イネ料植物かイネであることを特徴とする縁来切り乃至32のいずれか!項配載の単子薬植物の形験転換方法。

「翻来項34】数イネ柱植物がトウモロコンであること を特徴とする請求項1乃至32のいずれか1項配載の年子 葬植物の形質転換方法。

[発明の詳細な説明]

技術分野

本発明は、単子媒植物の形質転換方法に関する。 戦略技術 甲子葉植物の形質転換力法としては、従来より、エレクトロポレーション法、ボリエチレングリコール法(R 会)、バーティクレガン法その他が知られている。

2

ェレクトロボレーション社は、プロトグラストと目的 のDNAを組卸内に導入し形質転換を図る方法である。 よりDNAを組卸内に導入し形質転換を図る方法である。 この方法で覆々の遺伝子が中子集値物、特にイネに導入 されている(Torivama K.et al.,1985,Biotech,6:1072 -1074,Shimmoto K.et al.,1985;Biotech,6:1072 6,Roots C.A.et al.,1985;Science 240:204-207)。 しかしなから、この方法は、1)プロトグラストから 個体円生光が確立されている植物種のみに遺伝可能である。2)プロトプラストから個 個体円生光が確立されている植物種性までには裁り月を 契するので、形質転換体を得るのに時間がかかる、3) 培養期間か長期化するので、それに作り結繁変類の頻度 が高くなり、正常な形質転換を得るのに特別が低くなる。 という問題点を有する。

ECC地は、目的遺伝子とプロトプラストとを組合し、P ECCや型することによって遺伝子の導入を図る方法であり、エレクトロポレーション法とは総気的激がRGC交交かった点で写なる。導入的率はエレクトロポレーション社よりはいくる人低いと考えられる。この方法で形質を徴体を得た報告はあるものの、近く用いられているとは百い買い。プロトプラストを用いるため、エレクトロポレーション社と同様な問題点を持つ(Chanq w.et al., 1990;Blotech, 8:736-740)。

また最近、弱い酵素処型をしたトウモロコン未熱胚およびカルスに電気刺像によって遺伝子を導入する方法が 報告された(D' Halluin K.et al.,1992;Plant Cell 4:1495-1505)。導入された遺伝子の存在は再分化植物 体においても確認されている。しかし、まだこの方法で

の形質転換の成功例は一報のみである。

バーティクルガン技は、目的の遺伝子を領却な金属位子に付着させ、金属粒子を高速で細胞あるいば組織に撃ち込むことによって形質気後を行わせる方法である。従って、原理的にはあらゆる組織を対象に形質気後を行なうこ、原理的にはあらゆる組織を対象に形質気後を行なって、原理的にはあらゆる組織を対象に形質気後を行なって、原理的にはあらゆる相談を対象にあるとされている。

今までにトウモロコシではタイプエカルス(Armstron GC-L. and Green C.E. , 1985; Planta 164:207—214)を 材料化バーティクルガン送化より形質転換を行ない。そ こから正常な位性を有する形質転換体を得た報告がいく つかある(Gordon-Kam W. J. et al. , 1990; Plant Call 2:603—618, From M.E. et al. , 1990; Plotech. 8:833—83 9/Walters D.A. et al. , 1992; Plot Rep. 12:89—2 の Vain P. et al. , 1992; Plant Rol. 18io1.18:189—2 しかし、これらの報告のほとんどは、培養容易性の品種を材材として使用してわり、まだ。あらゆる品種にの品

Vasi1らはパーティクルガンによってコムギのエンブ リオシェニックカルスにパスタ、ピアラフォス等の除草 剤の主成分であるホスフィノスリシンをアセチル化する bar遺伝子(Thompson,C.1.et al.,1387;548の 1.6:2519 -2523)とOS遺伝子を導入し、パスタ抵抗性のカルス および再生植物体を得た。これらのカルスおよび再生植 物体における、導入遺伝子の産物である解素の活性を確 認し、またbar遺伝子が存在することをサザン分析で確 認し、とたbar遺伝子が存在することをサザン分析で確 認した(Vasi1 V. et al.,1992;8iotech.10:667-67

1.5にはバーティクルガンによってイネの未熟版および 30 エンプリオジェニックカルスにハイグロマイジン選抗性 遺伝子を導入後、競技を行ない、ハイグロマイジン選抗 性再生植物体を得た。この植物体でのハイグロマイシン 抵抗性遺伝子の存在をサザン分析で確認した。この後代 の費子のハイグロマイシン選抗性は3:10分離が見られ た (Li L.et al.,1993;Plant Gell Rep.12:30-25 Ghristouらはバーティクルガンによってイネの未換胚にbar、ハイグロマイジン抵抗性遺伝子およびGの遺伝子を導入し、ハイグロマイジンまたはピアラフォスに抵抗性でGS活性を示す植物体を抑て、導入遺伝子の存在をサゲン分析によって臨退した(Ghristou P.et al.,1991(liotech.9:957-962)。

<del>우</del>

Kozielらはバーティクルガンによってトウモロコシ来 熱胚にbar遺伝子とBr母素合成遺伝子を導入し、ホスフィノスリシン抵抗性植物体を得た。この植物体はBr母素 蛋白の合成と、サザン分析により導入遺伝子の存在が確 既された(Koziel M.G.et al.,1993; biotech.11:194-2 の)。 その他の方法としては、I)種子、胚とDNAの共存培 SD 養(Topfer R.et al.,1989;Plant Cell 1:133-139,Led

ax L.et al., 1974/Nature 249:17-21)、2)花符管への処理(Luo and Wu 1988; Plant Mol. 8tol. Rep. 6:165-13)リギソーム法(Caboche M.1999; Physiol. Plant. 79:173-176, Gad A.E. et al., 1987; Pheor. Appl. Genet. 75:10-16 があるが、形質転換の効率、用現性、あるいは汎用性に関して問題があり、一般的な方法とは言い騒

一方、アグロバクテリウム属価部のTiプラスミドをペクターとして用いた遺伝子導入法は、タバコ、ペチュニア、ナタネ等の双子葉作物の形質転換法として普遍的に用いられている。しかしながら、アグロバクテリウム属細菌の沼主は双子葉植物のみに限られ、単子葉植物には音生しないとされている(De Cleere M.1976;bot.fev.4。1976-64.

アグロバクチリウムによる単子薬植物の形質転換に関してはアスパラガス (bytebier B.et al.,1987,Proc.ka tl.Acad.Sci.USA.84:5345 - 5349)、そしてヤム (Diosc orea bulbifera) (Schaferw,et al.,1987,Nature 327:29-532) で報告されているが、その他の単子業植物、特にイネ料作物にはこの方法を適用できないとされている (Potrykus I.1990;Biotechnology 8:535-543)。

ものと解釈している (Grimsley et al.,1987;Nature 32 ときが最も高く (Grimsley et al.,1988;Biotech.6:185 -189) 、船垛にはアグロバクテリウムのブラスミドのv ところ、トウモロコシストリークウイルスの恩染を確認 められないことから、上の観察はアグロバクテリウムが 5:177-179)。 しかし、ウイルスは核ゲノムに組み込ま 後、懸燥効率はトウモロコシの茎頂の生長点に接種した したことを報告している。トウモロコシストリークウイ わなくても増殖する可能性があるので、この結果はT-ウモロコシストリークウイルス (Naize streak virus) のDNAを挿入したものをトウモロコン生民点に接個した ルスのDNAを接種しただけではこのような感染症状が認 DNAが核に組み込まれたことを示すものではない。その irc遺伝子が必須であることを示した (Grimsley et a GrinsleyらはアグロバクテリウムのT-DNAの中にト トウモロコシにDMを導入することができることを示す 1.,1989;Mol.Gen.Genet.217:309-316) .

Gouldらはトウモロコシの生長点に針で傷をつけた後カナマイシン近抗性遺伝子とGS遺伝子を持った結例原作アグロバクテリウムB4Mを保健し、処理後の生長点を付けてインフで選抜したころ。抵抗性を示す植物体を得た。この後代の種子が導入した遺伝子を持つことを顕認するためサブン分析を行ったところ。一部の種子で導起するためサブン分析を行ったところ。一部の種子で導起するためサブン分析を行ったところ。一部の種子で導起するためます。このことはアグロバクテリウムの理された生長点からカナマインン遺抜により得られた植物体に形質成数地間と非形質転換細胞が混在していたことを示す(キメラ現象)。

発明の阻止

Mooneyらは、アグロバクテリウムを用いて小麦の胚に 50

カナマインン低价性過伝子の導入を見みた。まず、胚を酵素で必回し、細胞壁に备をつける必回をし、その役プグロパクテリウムを接襲した。処団したカルスのちも留めて少数のカナマインン低价性と思われるカルスが増殖したが、カナマインン低价性適伝子の存在をサザン分析で確認したところ、全ての低价性カルスで導入過伝子の保護環境かられた(Mooney P.A. et al., 1991; Plant Cell, risse, Orqua Galture 25:209-218)。

**结件3328818** 

€

10 Raineriらはイネの低度に格をつけた後、強病原性の アグロバクテリウムA2B (pri8o542)をイネの8 品層に 処理したところ、日本地、幕坂5 号の2 品種で酸様状の 組織の増殖がみられた。まちに、TーDWからボルモン 合成遺伝子を除いた17ラスミドを持つアイジン抗抗 遺伝子とG2遺伝子を導入したプラスミドを持つアグロ パクテリウムをイネの低化接触したとこカナアイジン 抵抗性カルスの増縮がみられた。この既抗性カルスでは GS遺伝子の発射があられた。この既抗性カルスでは GS遺伝子の多数が認められたが、原質配換値物を得る ことはできなかった。これらのことから、アグロバクテ 10 リウムのTーDWがイネの細胞に導入されたと解釈して いる (Paineri et al., 1990; Blotech, 8:33-38)。

Cのようた、イネ、トウモロコン、コムギやの部のであってのようた、イネ、トウモロコン、コムギやの部の作物でもアグロバクテリウムによる適伝子様人が可能であることを示唆する研究報告が現れておているが、向れも再現性に問題があるほか、導入した遺伝子の確認だついても不完全で、説得できる結果が示されていなかった(Potrylas 1.1990; Biotech. 8:335 – 33)。

Gparらは2,4-D共行下で2日間は登したイネ本拠形 に付債後、ジャガイモ軽荷培養細胞を含む信節中でnpt 口道伝子とGS道に子を持ったアグロバクテリウムを復 種した。処理した未拠距をGug添加貨地上で毎及したと 乙多勝等されたカルスから再分化植物体が留られた。 存化が少分析で確認したとろ、再分化当代。似代い ずれの値物体でも導入通伝子の存在が認められたことを 相告している(Gba M.T.et al.,1931;Plant 助1.Biol, 22:491-506)。Cの格果は、アグロバクテリウムによ るイネの形質を後を支持するものであるが、形質施設的 車は1.6%と非常に低く、供試した未熟配数23のに対し、

単は1.0%と非常に低く、供収した米売班数220Kガレ、40 正常な生長を示した単生植物体は1個体に適ぎなかった。イネの米型胚を傾削するには多大な労力を受するため、このように低い形質転換効率では実用的なレベルにあるとは言い難い。

上述のように、イキ科作物における遺伝子導入法は、コレクトロボレーション法およびパーティクルガン法が主義である。エレクトロボレーション法の場合、プロトグラストを用いるため、再生植物を得るまで最短間を受し、 多大な対力がかかり、また既認回の给案により高報度で変異体が出現するという危険性がある。また、この

従って、本発明の目的は従来の方法に比較して、形質 **元数から値物体の再生までの時間が短く、プロトプラス** トからの植物体の再生が確立されていない植物に対して も登温的に適用することができ、特殊な装置を必要とせ ず、さらに用いる材料の調製が容易な単子集植物の形質 転換方法を提供することである。

す影響等を鋭意研究した結果、単子葉植物の脱分化処理 特盟的に指い効率で形質転換ができること、そしてこの 本頃発明者らは、アグロバクテリウムで処理する単子 集団物の植物組織、アグロバクテリウムの処理条件、及 びパイナリーベクターの構成等が遺伝子導人効率に及ぼ していない未熱胚をアグロバクテリウム属細菌を用いて 方法には再現性があり、これによれば上配目的を達成す **ることができることを見出し、本発明を完成した。** 

い未熱胚の胚盤を形質転換することから成る、単子葉植 すなわち、本発明は、所望の遺伝子を含有するアグロ パクテリウム原細菌で単子薬植物の散分化処理していた 物の形質転換方法を提供する。

オオムギ等のイネ料植物を始めとする単子紫植物に目的 なった。アグロバクテリウムを用いた単子葉植物の形質 反換方法はこれまでにもあるが、前述のとおり確立され た方法とは含い難い。しかし、本発明ではこれまでに用 いられていない既分化処型していない未熟胚に本発明で 改良した方法でアグロバクテリウムを接種することによ り、価めて容易に遺伝子を導入することができた。本発 明の方法では材料調製が容易な未熟胚を用いるので、生 **長点を用いる従来技術に比べて供試材料を容易に得るこ** の外来遺伝子を再項性良く導入することが初めて可能に 本発明の方法により、イネ、トウモロコシ、コムギ、

8

とができる。また、形質転換は未熟胚の胚盤になされる

た、スーパーパイナリーベクターを用いれば、トウモロ コンや一部のイネ品種のように培養が困難な品種にも高 ため、ブロトブラストを形質転換する場合に比べて植物 体再生までの時間が短く、変異の頻度が低下する。ま い効率で遺伝子を導入することが可能である。 図面の簡単な説明 図1は、本発明の方法に用いることができるアグロバ クテリウム原細菌に含まれるブラスミドの一例であるpT OK162の構造と本発明の実施例で用いたブラスミドpTOK2 32の構築方法を示す図である。 図 2 は、図 1 と同様にps81の構造とブラスミドps8131 の構築方法を示す図である。

ムギ、コムギ、アスパラガスその他、いかなる単子葉植 本発明の方法により形質転換される単子葉値物は、特 シ、オオムギ及びコムギ等を包含するイネ科植物が好ま に限定されるものではなく、イネ、トウモロコシ、オオ 物にも辺用可能である。もっとも、イネ、トウモロコ しく、とりわけトウモロコンが好ましい。 発明を実施するための最良の形態

未熟種子の胚を言う。また、本発明の方法に供される未 正常な個体を再生する能力を有するカルスを誘導できる ンブレッド、インブレッド間の口、インブレッドと自然 本発明において、未熟胚とは受粉後の登熟過程にある く、受労役いかなる時期に採取されたものであってもよ 受份品種間のら、 市販り品種の未熟胚であることが好き 米熱胚胚盤を用いることが好ましい。また、米熱配はイ た、後述の形質転換後、後述の方法により、脱分化し、 い。もっとも、受精後2日以降のものが好ましい。ま 熱胚のステージ(熱期)は特に限定されるものではな

殖するカルス等の未分化状態の細胞塊を得るための処理 本発明において、脱分化処理とは、植物組織の 分化した細胞を配分化培地において培養し、無秩序に増 ## 7,

4. Jin, S. et al., 1987; J. Bacteriol. 169: 4417 - 4425, K きる。これらのものの多くはAgrobacterium tumefacien s出来のTiブラスミドのグ・ルレンス質核(vir密核)由 で挿入されるものである。また、小鞠らは、Agrobacter ium tumefaciens A281という強病原性の、形質転換効率 が価めて高い株 (Hood,E.E.et al.,1984;Biotech.2:702 「iブラスミド又はKiブラスミドを持つ、従来より双子葉 植物の形質転換に用いられているものを用いることがで しようとする形質を担う遺伝子はこのベクター中に挿入 されるか、またはこのベクターとは別のブラスミド中に 存在し、相同相換え等によりTiブラスミド中にin vivo -709. Hood, E.E.et al., 1986; J. Bacteriol. 168: 1283-来のDNM領域を含むベクターを有しており、植物に付与 omari, T., 1989; Plant Science 60:223-229, ATCC3734 1290, Komari, T. et al., 1986; J. Bacteriol. 166:88-9 形智転換に用いられるアグロバクテリウム属細菌は、

**-」と呼ぶことがある)を開発した(特関平4 – 222527** 数(vir函数)由来のDNA図数を合むペクター(本明描色 なおいて、このベクターを「スーパーパイナリーベクタ 月)。本発明では、このようなスーパーパイナリベクタ 9) に含まれるTiブラスミドpTTBo542のヴィルレンス観 **一を好ましく用いることができる。** 

びAgrobacterium tumefaciens中で増殖可能であるpTOK1 は、単子集植物に導入しようとする遺伝子がpTi8o542の このようなスーパーパイナリーベクターの例として吓 由来の既にクローン化されていた上記15.2キロベースの SAと呼ばれるブラスミド (Tiブラスミドから誘導された **短棋を包むプラスミド)にpTi8o542のヴィルレンス短数** kpml断片(virB,virG,Virc各遺伝子を含む)を組み込ん してカナマイシン耐性遺伝子が配列されており、この例 その構造を図1に示す。このブラスミドは、大脚菌ねよ 紀列とその間に単子集値物に導入しようとする遺伝子と 公知のpGA422ブラスミドと pACG012と呼ばれる公知の広 だものである。このpTCK154には、丁領域の2つの境界 グェルレンス領域由来のクローン化されたDNV断片を包 OKIG2 (特開平4-222527号)を挙げることができる。 宿主域ブラスミドから後述の方法により構築された。 有するブラスミド上に配置されている例である。

しも容易でないことがある。このような場合にはAgroba (Herrera-Estrella, L. et al., 1983; EMBO J.2:987-95 とが可能になる。すなわち、例えば、先ず、pioK1GをA とになる。pRR32以よpTCK162と異なりAgrobacterium tum ろ、pRR322誘導体の選抜マーカーとしては、トランスポ 単子葉植物に組み込もうとする所望の遺伝子は、上記 (類似のブラスミドを含む) を導入する。pTOK162のDNA にはpR322と相同な部分があるので、pBR322勝導体は相 hた状態 (pTOK162::pR32288海体という) でなければA り組み込むことができ、ブラスミドが有する薬剤耐性等 cterium tumefaciens細胞内のin vivo系での相同組換え 5. Horsch, R.H. et al., 1984; Science 223:496−498) 🏖 grobacterium tumefaciens仏導入しておいて、この菌を **存在(繋剤耐性等)について選抜すれば、pIOK162::pBR** 322誘導体を有するAgrobacterium tumefaciensを得るこ 数の趙敬節位を持しものは、通信のサンクローンドング 利用することにより、目的のDNAをpTOK162に導入するこ efaciens中では複製できないので、このような組み込ま unefaciensK各種のブラスミドを導入して研究したとこ の手法では所型のDNAをT領域内に導入することが必ず さらに所望Ovaを導入したpBR322と呼ばれるブラスミド 同配列を介した組換えによりpTOK162に組み込まれるこ とができる。さらに、pTOKLのを有するAgrobacterium グラスミドのT-DNA領域中の制限酵素部位に常法によ る. もっとも、図1 K示すpTOK162のようK、大型で多 い。そして、pTOKL62とpBR322誘導体の各々に特異的な grobacterium tumefaciens中で生存することができな の適当な遊択マーカーに落ついて選択することができ

**标第3328818** 

9

子を導入することができる。またその他の場合には、pB />Tn7 (De Greve, H.H.et al., 1981; Plasmid 6:235-2 **ていることが判明した。従って、すでに所組の遺伝子が** のブラスミドに抑入すれば、Agrobacterium tumefacien 外の相同組換えにより、piucicoの丁寅岐に所宜の遺伝 子と所知の遺伝子を別々のT饃峻中に配置することも可 質転換した場合、両丁質域とも導入される場合も相当の 48) 由来のスペクチノレイツン耐性遺伝子 (タト) が優れ 用意しておいて、これに所収の遺伝子を加入する方法も 船である。カナシイシン耐性をマーカーとして植物を形 比率で生じるわけであるので、目的遺伝子の導入は十分 pBR322にクローン化されている場合には、SP遺伝子をそ 最終的に、proctの上において、カナッイシン
団在遺伝 途成できる。また、両丁俶伐が別々の染色体に組み込ま **れる場合もあり仰るので、彼に目的の遺伝子をカナマイ** R322出来のDNAと SP遺伝子から構成されるプラスミドを 考えられる。この際、丁俶城の境界配列を活用すれば、 シン耐性遺伝子から分離することも可能となる。

奇生となるアグロバクテリウム属細菌としては、特に 限定されないが、Agrobucterium tumefacionsを好まし く用いることができる。

ことができ、例えば、細菌の三系交雑手法 (Mtta,G.et パクテリウム関細菌に導入する操作は従来法により行う al.,1980; Pro. Natl. Acad. Sci. USA 77:7347-7351) (C プラスミドをAgrobacterium tumefacions母のアグロ より行うことができる。 **このようにして誤取されるアグロバクテリウム団相菌** には、pTOK162由来のヴィルレンス能力の高いDNAが合き れるので、高い効率で単子集団物の形質転換を行うこと が可能である。

る遺伝子は、従来の技術と同様に丁領域の境界配列の間 に配置されるものであるが、アグロバクテリウム周相倒 中で、ロブラスミド上に配置されてもよく、または他の 尚、本発明においては、母子集価物に導入しようとす

アグロバクテリウム周細菌で単子薬植物の未熟胚を形 質転換する方法は、未然胚をアグロバクテリウム属相菌 ば、10~10~1個1相的/m)程度の細胞温度のアグロバクテリ と単に接触させることにより行うことができる。例え ブラスミド上に配置されてもよい。

ことにより行うことができる。形質転換に供する未熟胚 アグロバクテリウム属細菌を用いた植物の形質転換方法 ウム国細菌糖剤液を調製し、この壁剤液中に未熱肌を3 ~10分回程度没済後、固体培恤上で数日間共存培会する では、アグロバクテリウム阿細菌と接触させる前に、2。 **厩発明者らはこの脱分化処阻が不安であることを見出し** た。よった、本発型の方法は、従来の方法に比べた関係 は、2,4- D共存下での培養等の配分化処団を行うこと 4-Dとの共存均益等の既分化処理を行っていたが、本 なく、未熟胚をそのまま形質転換処理に供する。従来、 であるという利点を有する。さらに、植物によっては、 8

り配分化され、脱分化状態で形質転換細胞の遺抜、増殖 い。形質転換細胞からの植物体の再生は公知の方法(い C.E.and Phillips,R.L.,1975;Crop Science 15:417-42 1, Duncan, D.R. et al., 1985; Planta 165;322 — 332) K. 🖈 を行うことが好ましい。遺抜は、前記所望の遺伝子の発 正常松性を有する形質転換値物体を再生することができ る。なお、これらの具体的操作の一例が下記実施例に詳 形質転換した未然胚は、その後、公知の方法 (Green, ppotto, E. and Lusardi, H.C. 1988; Naydica XXXIII:163-177) により行うことができる。これにより所望の形質 正常個体再生能力を有するカルスであることが好まし を獲得した植物体、好ましくは、所望の形質を獲得し、 **頃に基づいて行うことができる。股分化状態の細胞は、** 近されている。

2

#### (1)供送組織の開設

(二) トセトロコンの四葉

k Mexican Sweet) ,F1 (A188  $\times$  B73Ht) ,F1 (B73Ht  $\times$  A t, W117Ht, Ch43, H99, W64A Ht rhm, F1 (A188 x Blac (CLO3 × A188) を材料として適定した。P3732は磐田略 製協问組合より入手。全てのインブレッド及びBlack Ne rican Sweetのいずれの品種も異林木産名生物資源研究 トウモロコシ品積P3732, A188, H84, B37Ht, Mo17H 188) , F1 (H84 x A188) , F1 (M017Ht x A188) , F1

(ii) イキの品類 **沂から入手した。** 

<del>수</del>

日本福品種、月の光を選定して供試した。

(イイ゙i) トクモロコシ基団組織の調製

ន **亜塩紫酸ナトリウムに5分間浸漬後減菌水で3回洗浄し** 7c。 洗净後15個体培地(1.5主要塩類,1.5換量塩類(Lins トウモロコン程子を70%エタノールに1分間、1%次 maier E. and Skoog F.1965; Physiol. Plant.18:100-12 塩、1mg 1チアミン塩製塩、100mg 1ミオイノシトール、 7)、0.5mg mlニコチン観、0.5mg 1ピリドキシン塩観

約4日後、発芽した幼苗から頂塩分裂組織を含む約0.1 2.3g 1ゲルライト)に隣床し25°C、既倒下で倍換した。 (Obrid 1カザミノ酸、700mg 1ブロリン、20g 1ショ猫、 ×0.3mの組織を切り出し材料とした。

花粉受粉後約14日目に雌穂から長さ1~2mの未熟胚 (iv) トウモロコン米松用の調製

(v) イネ末熱胚の調製 を無菌的に単離した。

開花後、7~12日目の未熟種子を餌を除去した後、70 間浸漬することにより消毒した後、未熱胚を取り出し供 %エタノールに30秒、1%次亜塩素酸ナトリウムに10<del>分</del> 故材料とした。

ハイグロマイシン抵抗性遺伝子 (HPT) 、ホスフィノ (2) バブラスミド

スリシン(PPT)抵抗性遺伝子(bar)およびGAS遺伝子 をTiプラスミドのT-DW銀域に組み込んだ、以下のプ ラスミドを作製した。

(i) pIGIZIHm:

遺伝子と、ハイグロマイシン抵抗性遺伝子と連結したブ (現代化学增刊, pp.123-132)。名古虽大学、中村氏 ヒッのカタシーゼ遺伝子の第1イントロンを含むGUS ラスミド (中村ら、1991;植物パイオテクノロジーロ より入手)。

(a) イントロンQiSおよびハイグロマイシン抵抗性遺 (ii) pTOk232:

Tn7由来のスペクチノマイシン抵抗性遺伝子を含むCla つ、これをptC13のSma 1部位に移入つ、アンドシリンお よびスペクチノマイシン抵抗性遺伝子を持つブラスミド で処理し、スペクチノマイシン抵抗性遺伝子を含む2.5k tが片をpGA482のEcoR 1、Hind IIIが片(2.7心)と連結 pTOKL07 (5.2kb) を得た。pTOKL07をEcoR I, Hind III し、スペクチノマイシン抵抗性遺伝子とHind III、Hba I断片 (2.5tb) をクレノー処理により末端を平滑化 I部位を含むpTOK170 (5.2kb)を得た。 们子の中国ペクターpIOC29への導入

8

る。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるもので

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明す

(pCAACCTTG;タカラ酒造コード4660P)を挿入した。35S プロモーターおよびイントロンGISを含む断片をHind II 抵抗性遺伝子を連結したpGL2 ( J. Paszkowski, Friedrich しpGL2-IG (7.614) を得た。なお、pGL2はpDH51 (Met る. pTDK170をHpa 1処理して得られた断片をpGl.2-1GD 1.,1990,名古因大学中村氏より譲渡)をEcok Iで切断後 Iにより切り出し、35Sプロモーターにハイグロマイツン 5868) にハイグロマイシン抵抗性遺伝子 (Gritz L.and 355プロモーターにヒマのカタラーゼの第1イントロ razak et al.,1986;Nucleic Acids Research 14:5857-Davis J.1983; Gene 25:179-188) を挿入じたものであ ンとOLS遺伝子を連結したベクターpIQ21 (Ohta et a Miescher Instituteより入手)のHind III部位に挿入 Pw II断片 (5.2ね) と連結しpTOIC29 (10.11ね) を得 クレノー酵素により末塩を平滑化しHind IIIリンカー

13

(P) pavB1の構築

特許3329819

8

れた菌には両ブラスミドの組換えによって生じたブラス ミドのみが含まれることになる。スーパーパイナリーペ クターにハイグロマイシン抵抗性遺伝子、イントロンGJ S遺伝子が組み込まれたプラスミドをpTOK232と呼ぶ(図 両ベクターは大腸菌ブラスミドpBR322に由来する部位を 持つので、スペクチノマイシン、カナマイシンで選抜さ リウムA281由来のArg、Arg、Arg)のAgの子を替入して移 スーパーパイナリーベクターに強成原性アグロバクデ (ハイグロマイシン抵抗性遺伝子、イントロンGJS遺伝 たスーパーパイナリーペクターpTOK162への目的遺伝子 子)の導入は相同組換えによって行なった。すなわち、 (b) スーパーパイナリーベクターpTOK162への導入

性アグロバクテリウムA281由来のvir倒域。「ORIJはCo はホスフィノスリシン抵抗性遺伝子、「IG」はイントロ 位、「K」は制限酵素kpn I部位、「H」は制限酵素ktin なお、図1及び後述の図2において、「SP」はスペク ンCOS遺伝子、「BR」はTーDNAの右ボーダー配列、「B こ はT - DWの左ボーダー配列、「vie,C,C] は強風風 チノマイシン抵抗性遺伝子、「hrt」はハイグロマイシ 子、「TC」はテトラサイクリン抵抗性遺伝子、「BAR」 ン抵抗性遺伝子、「NPT」はカナマイシン抵抗性遺伝 |E1の複製開始点、「COS」はラムダファージのCOS部 d III部位を示す。

(a) pSBL3Lの情報 (iii) pSB131

NAポリメラーゼ処理後、Sal Iリンカー(5′ – CCTCCAC pTOKL70をBank 1およびBql ITで切断後開展し、pYS13 8とした。pVS138をEcoR IおよびASp718で切断し、T4 D C-3′)を挿入し閉環しかS151を作成した。pvS151をS し、14 DNAポリメラーゼにより平滑末端化後、Hind III リンカー (5′-CAACCTIG-3′)を抑入し閉環し、(4′ られたブラスミドをpICK246と命名した。pICK246をHind Dordrecht、1988)のT-DNAを含む4.7kbのSal I断片を 導入しpIOK235を作成した。pIOK235をSac 11部位で切断 IIIおよびEcoR Iで切断し、T-DNA中の大部分のDNAを al Iで切断し、この部位に、pGA643 (An et al.,Plant Molecular Biology Manual A3:1—19,Kluwer Academic, **除去した後、355プロモーターにホスフィノスリシンア** セチルトランスフェラーゼ遺伝子 (特表平 1 – 503434) を接続した遺伝子(bar遺伝子、植物にホスフィノスリ シン耐性を付与する能力を有する)を含む2.2kbのHind III-Econ 1断片を挿入しpSR25を得た。さらに、pSR25

た。pvCk1010をHind IIIとXno Iで切断し、Hind III-S IIで切断後間環する操作を行ったところ、Rg) II部位が al Iで切断したpuciaと結合しpTOKISOを作成した。pTOK EcoR IKより夕磨し、14 DNAボリメラーゼで包围後路職 pWCK101 (Knauf et al., Plasmid 8:45—54, 1982) 🏖 することによってEcoR I部位を削除した。さらに、Bal 即除できたので、このブラスミドをpvCx101Qと命名し

斯し、2.744断片を除去し、pTOIQ36の2.74b Xba I-Eco 150をHind IIIで切断し、T4 DNAポリメラーゼ処理後Eco を作成した。pTOA236をXba 1およびEcoR Iで分解し、2. - (5' - CCTCCACG-3') を抑入し証拠してpTOAC36 6dを形と生命した。piOK239をEcok 1なよびXba 1で切 R Iリンカー (5′ - CCCAATTCCG-3′) を挿入し記録 pTOIC239とした。pCA482をitpa 1で切断し、Xho 1リンカ クセプターベクターの1種であるが、T-CNAやヴィル することにより、Hind III部位をEcoR I部位に敷設し、 R I断片を抑入し閉環してDNB1を作成した。DNB1ば、ア レンス領域由来のDWなどは含んでいない。

(c) pSB1の構成

2

ure Gollection受託番号37349)のヴィルレンス匈奴の 相込んだいイブリッドベクターを作成した場合、ヘルパ DNB1をKpm Iで切断し、pTiBo542 (American Type Cul **て厨扱してpSB1とした。pSB1は、アクセブターベクター** ープラスミドと組合わせることにより、スーパーパイナ virBbよびvirG遺伝子を含む15.2kb Kon 1形片を哲人し の一様わめり、Cれに、TIPMを含む中国スクターや リーベクターを構成することができる。

(d) pSB31のpSB1への導入

pSB1に導入することによってpSB1.11を作出した(図2 鋍 pT0k232の場合と同様に、pSB31を相同組換えによって

(3) 寄生アグロバクテリウム

スミド(vir配域を完全な形で持つ)PALA404を有する傾 系であり、American Type Culture Collectionより入手 T - DNA領域を削除した協発、LBA4404とEHA101とを背 可能である (AICC 37349)。EMAIDIはヘルバーブラス ミドのvir観域が強肉原性アグロバクテリウムA281出来 主バクテリアとして使用した。LBM404はヘルバーブラ であり、Hood E.E.et al.1986 (上松) から人手可能で (2) 斑で遊べた穏々のパイナリーベクターをこれら 2種類のアグロバクテリウムに導入し、以下の菌系を遺 伝子導入用として用いた。 これちのブラスミドをアグロ パクテリウムに導入する方法は桐苗の三系交雑手法(Di tta G.et al.,1980;Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:7347-

LBA4404 (pT0IC32) LBA4404 (pSB131)

- ターとイントロンGJSを含む3.1MのHInd III膨形を挿

**入しpSB31を作製した。すなわち、pSB31は、T-DW組** 域中に、植物中で発現するイントロンOUS遺伝子とホス フェノスリンン配件遺伝子 (bar) を含む中間くクター

をhind IIIで切断し、pIG21より単鍵した、355プロモ

EHAIOI (pIGI21HM)

## (4) アグロバクテリウム緊急液の調粒

頃、0.2Mグルコース)に各々賠償し、街線度を3~5x10 A的音地《Drlica K.A.and Kado C.I.1974; Proc.Natl.A イネへの接種には修正AA倍地(AA主要無機塩類、AAアミ T. and Skoog, F. 1962; Physiol. Plant. 15:473—497), 1. アグロパクテリウムのコロニーを白金耳でかきとり、ト キシン塩酸塩、1mg 1チアミン塩酸塩、100mg 1ミオイノ シトール、1.5mg 12,4-D、1g 1カザミノ酸、100μM /限及びAAビタミン類(Torivama K.and Hinata K.198 cad.Sci.USA 71:3677-3681) 上で3~10日間培養した Og 1カザミノ観、100μMアセトシリンゴン、0.2Mショ 数、LS機関指数、0.5mg mlココチン数、0.5mg 1ピリド アセトシリンゴン、0.2M/ショ糖、0.2Mグルコース)に、 5;Plant Sci.41:179—183) ,MS改回塩類 (Nurashige, ウモロコンへの按钮には相涵器圏用LS倍地(LS主要塩 **価的/向に質問し用いた。** 

#### (5) 接種および培費条件

2 リウム駐園液に3~10分間後潰した。投資処理後、塞頂 数塩、100mg 1ミオイノシトール、1.5mg 12,4- D、700 後のイネ未然胚はアセトシリンゴン、ショ糖、グルコー 供試組織を減菌水で洗浄後、茎頂組織はガラス針(自 **叙製)で穿刺後、木熱胚はそのまま上述のアグロバクテ** 組織は100μMアセトシリンゴン、20g 1ショ糖、10g 1 0.1mg 1カイネチン、1.0mg 1カザミノ酸、2.3g 1ゲルラ シリンゴン、20g 1ショ糖、10g 1グルコースを含むLSD チン数、0.5mg 1ピリドキシン塩酸塩、1mg 1チアミン塩 C、暗黒下で1~5日間培養した。その後、洗浄するC となく(洗浄すると形質転換植物の再生効率が低下)接 都路的地(LSDL. ) (共存的地かのグルコース、アセトシリ ンゴンを除いた組成)で培養を続けた。また、設積処理 ミン類 (On C.C.1978 Proc.Symp.Plant Tissue Cultur Pag 12,4— D、2g 1ゲルライト)C(移植し、25,C、 時瓜 し、同議度のセフォタキシムを含むLS倍地で培養を続け 1.5共存培協(LS主责知题,LS級重知额,0.5mg ml = 3 mg 1プロリン、500mg 1 NES、8g 1楽天)に移館し、25 建未熱胚を250mg 1セフォタキシムを含むLSD1.5カルス スを同頃度で含むZNG固体倍換(NGの無機塩およびビタ 下で2~5日間培養した。その後、接種未熱胚を250mg た。没済処里後のトウモロコシ未熟胚は100mMアセト 1セフォタキシムを含む試道水で洗浄し、同濃度のセフ r タキンムを含む2NG固体培殖で3日~1週間培養を行 イト)に移储し、25℃、照明下で2~3日間培養した。 a.Scionce Pross Peking,pp 43—50) 1g 1カザミノ酸. グルコースを含む修正し合物 (LS主要塩類、LS液量塩 **値、1mg 1チアミン塩製塩、100mg 1ミオイノントール** 数、0.5mg mi ユコチン数、0.5mg Jアリドキシン独数 その後、250mg 1セフォタキシムを含む設菌水で洗浄

(8) aus沿柱の設位方法

- D - グルクロン酸(X - gluc)および20%メタノール **橋数に対する百分率で表した。また、遅抜処理後得られ た形質転換細胞と考えられるハイグロマイシンあるいは** ホスフィノスリシン抵抗性カルスおよび形質転換植物体 置した。リン酸极衝液でアグロバクテリウムを除去した 後、1.0mMSープロモー4ークロロー3ーインドリルーβ を含むリン散殺衝液を認加した。3FCで24時間処理した 後、青色の星色を示す組織を顕微鏡下で観察し、供試組 でのaish社の判定に関しては、抵抗性カルスおよび植 0.1Mリン酸板角液 (pH6.8) に改造し、37.Cで 1 時間部 物体の一部を切取り回様な方法によりGLS染色を行っ

# (7) 形質転換細胞の選抜と植物体再分化

イシンまたは0~20mg 1 PPTを含むLSD1.5カルス増殖培 地で約8週間培養し抵抗性のカルスを選抜した。 この抵 抗性カルスを30mg 1ハイグロマイシンまたは0~20mg 1 を除き、50mg 1ゼアチンを加えた組成)に置床し、25℃ アグロバクテリウムを接種したトウモロコシ未熱胚を PTを含むLS/拾地(LSD1.5カルス協選培始から2,4-D 250mg 1 セフォタギシムおよび0~100mg 1ハイグロマ 照明下で培養し再分化を行った。

イネ未熱胚を250mg 1セフォタキシムねよび50mg 1ハ

D、0.5mg 16BA、30g 1ングガトッグ、20g 1ツ単数、2g グロマイシンを含む植物体再生用のNGS培物(12歳度NG し、抵抗性のカルスを選抜した。さらに、この抵抗性カ |ゲルライト) で2~3週間培養したのち、SOmd 1ハイ 主要無偽塩類、NG微型無偽塩類、N6ピタミン類、1g 1カ ザミノ酸、0.2mg 1 NAA、1mg 1カイネチン、3g 1ゲルラ ルスを100mg 1ハイグロマイシンを含むNG-7 培地 (NG 無数哲挺、N5ピタミン類、2g 1カザミノ酸、1mg 12,4-イト)に移植した。なお、培地にはすべて250mg 1セフ イグロマイツンを名む SNG固体治地で3~4 週間治療 \* タキンムを添加した。

(8) トウモロコン形質転換次世代における導入遺伝子 の発現 LBA4404 (pSB131) を接續しppT遺抜により得られた形 子の発現を調査した。またこれらの幼苗の葉の一部に50 ()倍に希釈したバスタ(Hoechst, PPTを主成分とする除草 た。LBA4404 (pIOK233) を接種しいイグロマイシン選抜 により得られた形質転換植物も非形質転換植物 (品種A1 質転換当代植物を自殖し次世代種子を得た。 これらの種 に形質転換当代植物を非形質転換植物 (品種A188) と交 配後約2週間目の未熟胚を採取し10mg 1 PPTを含むLSD 子を揺毽後約2週間目の幼苗から葉片を採取しGUS遺伝 類)液を数布し2週回日にPPF抵抗性を間強した。さら 1.5カルス誘導培地に配尿した。25℃、暗黒下で3週間 88)と交配し、次世代植物の幼苗でaus遺伝子の発現を 培養後カルス形成の有無を指標に PPT抵抗性を調査し

(9) サザン法による導入遺伝子の分析 共存培養処理直後、組織を0.1%Triton X-100を含む 50

存許3329819

のアグロバクテリウム菌系EI W101 (p1G121)m) を単雌し たトウモロコン客団組織の処団し、生長した値物体での

QIS活性を調査した。アグロバクテリウム非処理の組織

ではいずれもGIS遺伝子の発現はみられなかったが、ア

\*とした形質転換が可能であることを確認するため、何述 Molecular Cloning (Sambrook et al.1989;Cold Spri ng Harbor Laboratory Press) K配数の方法に従って行 菌系LBA4404 (p581.31) を接種し、PPT遺抜により得ら **たた形質転換体当代ねよび次世代のトウモロコン幼苗か** 5小御ろの方法(Komari et al.,1989;Theor.Appl.Gene 阪酵素Barti 1を処理し、GIS遺伝子およびbar遺伝子をブ 末猶までのDNA質域の長さはCJS遺伝子で約2.3kb, bar道 t.77:547—552) に拾いDNAを抽出し、抽出したDNAZ的 た。T-DNA内部のBank Iサイトからしボーター配列の 伝子で約2.74である(図2)。なおサザン荘について ローブとしたサザン法による導入遺伝子の検出を行っ

グロバクテリウム処理した組織では針で穿刺した部分に

Couldらの報告 (Could J.et al.,1991;Plant Physio (10) トウモロコン茎頂組織への遺伝子導入

点近傍は非常に領細な組織であり、そこに穿刺しアグロ パクテリウムを屈染させることは容易でない。 本英殿の 転換には生長点の切り出し、穿刺などに熱傾した技術が **結果から生長点近傍へのアグロバクテリウムによる形質** ろ、QLG遺伝子の発現を示すものは全くなかった。生長 as遺伝子の発現が小さな点状に認められた。しかし、 その後培養を続けた植物体でGUSSF性を調査したとこ 必要であると考えられた。 2

トウモロコシ茎頂組織への遺伝子導入 .95:426-434) による生長点組織(基頂組織)を材料 \*

供試組織数	生長した植物体数	得られた 植物体数	GUS+ 菌物体数
2.4	6	2	0
2 6	∞	9	0
1.7	1.3	2	0
1 4	_	0	0
4 5	14	7	0
3.2	1 4	80	0
3 0	2	1	0

### 供試品種はいずれもP3732

(11) トウモロコシ米熱胚への複雑

トウモロコシ未熱胚を材料として、アグロバクテリウ **責任子発現がなされた。また、EHA101(pIG121Hm). LB** ムを処理した場合、供試したいずれの品種でも高率でCU ではっきりと確認できる大きさであり、広範囲の細胞で S遺伝子の発現がみられた。 QIS遺伝子の発現部位は内限

断される.

からアグロバクテリウムによる形質転換法において、米 熱胚は安定して高率の略像を示す適当な材料であると判 40 の遺伝子発現率の怠は認められなかった。 これらのこと A404 (pTCA232) および(BA46A (pSB131) のמ系間で

 $\Xi$ 

特許3329819

22 トウモロコン未熟胚へのGUS遺伝子導入効率

ಸ **数** 

明明	國光	GUS+組織数/供試組織数(%)	式組織数(%)
A188	-	32 32(100)	(0)
A188xB73Ht		32 32(100)	0
B73Htx4188		76 77(99)	•
BMSxA188	_	63 63(100)	6
A188	6)	65 66(98)	•
H84	61	26 30(84)	•
B37Ht	2	20 20(100)	6
Mol 7Ht	2	24 25(96)	•
1117Ht	2	15 15(100)	6
Oh43	ان	17 20(85)	_
H99	Ċ1	25 25(100)	6
154.4 Ht rhm	6.1	10 10(100)	6
A183xB73Ht	¢)	34 34(100)	6
B73Htx1183	61	49 49(100)	6
B#SxA183	61	29 59(100)	0)
A188	က	15 16(91)	_
H84xA188	e	20 20(100)	6)
Vol7Ht x A18S	es	8 10(80)	
C103x4133	က	11 11(100)	6

BNS:Black Mexican Sweet

茵系 1:EHA101(p16121Hm), 2:LBA4404(pTOK232), 3:LBA4404(pSB131)

(12) 前位養したトウモロコシ未熟胚への接種(比較

2日間培養(戦分化処理)した未熱胚を用いている(G) Chanらはイネのアグロバクテリウムによる形質転換の 材料にN. RD倍鉛(N. 主要塩類、N. 領面塩類、N. ピタミン 陸、3%ショ陸、0.8%アガロース、2mg 12,4−D) た an M.T.et al., 1993; Plant Nol. Biol. 22:491-506) .

S

あるかを確認するため、LSD1.5カルス誘導培恤で2日間 ムによる形質転換を試みた。接種および共存培養は前述 培養した未熟胚 (品種A188) を材料にアグロバクチリウ た。対照として採取直後の未熟胚を同様に試験に供し た。共存培養3日目に両試験区の未熱胚をdr染色した の方法に従った。供試菌系はLBA4404 (pSB131) とし

トウモロコン未熱胚を用いた場合にもこの方法が有効で

特許3329819

3

\*った(表3)。このことから、前培養した未熱胚を材料 とした場合、トクモロコシの形質転換は達成されないこ とが明白である。 を接種した未熱胚では染色されるものは全く見られなか米 ところ、採取直後に接種処理を施した未熱胚のほとんど が染色されたのに対し、前培養後にアグロバクテリウム

表3.前培養したトウモロコシ朱熱胚へのGUS遺伝子導入効率

GUS+組織数	1 3
供試組織数	2 1 2 0
未熟配	2 日間培養 採取直後

(13) トウルロコッ形四転被笛包の確認

器をしたカルスをQus数色したところ、カルス全体でQus 遺伝子の発現が認められた。このカルスから小朝らの方 抜し、75mg 1ハイグロマイシンを会む培地で抵抗性の論 法 (Komari et al.1989;Theor.Appl.Genet.77:547-55 30mg 145よびSOmg 1ハイグロシムツン資価結婚上が過 2) に従い抽出したDNAを鋳型とし、GUS遺伝子を増幅さ せるブライマー(5 - ATGTTACGTCCTGTACAAAC-3'

反応 (PCR) を実施した。反応は、1 μ I のDNW溶液、5p Mの各々のブライマーの混合物、2004MのdATP、dCTP、dC TPなよびdTTP、PG被衝液(短高遊社製)なよび2,5UのA 5、 —ATGCTCCCCCACCACACTTG—3、)を用いて複製連鎖 mplitad DWvポリメラーゼ (宝酒造社製)を使用して全

り94℃、2分間にわたり55℃、および3分間にわたり72 ンを含む79Xpの領域を増備させるブライマー(5′-G ACCITIATOAACTACCCACA-3', 5' - TAAAAACCCCACCAC (パーキン エルマー セタス社製)中で:1分間にわた よって分離した。アグロバクテリウム非魁染カルスかち 抽出したDNAを鋳型とした場合、DNAの樹福断片は検出さ 検出された。また、アグロバクテリウムのvirg開始コド 'C。 KC性成物を、0.7%アガロースゲル上で電気泳動に わなかったが、LBM4404(pTCK232)および抵抗性カルス 1.8kbpの増幅断片がエチヂウムブロマイド染色法により イルに従って30周期を繰り返した ;ONAサーモサイクラー 容積10041で行なった。反応は下記の温度のブロファ から抽出したDNAを鋳型とした場合、電気決動によって

されなかった。このことから、抵抗性カルス全体でみら るものであり、段階的にハイグロマイシン遺費を高めた **福地上で植殖したコンパクトで、 C 4状のカルスは形質** スから抽出したUMを辞型とした場合、地価販庁は検出 れたCAS遺伝子の発現はカルスに付着したアグロバクテ リウムによるものではなく、導入されたasaid伝子によ 転換体であると考えられた。

(14) トウモロコン形質転数値物体の遺抜

行ったところ、ハイグロマイシン遺抜では供ばした未熟 **共存培益後、30~100m 1のハイグロマイシンまたは** 5~20mg 1のPPTを含む倍地上で抵抗性カルスの選抜を

植物の葉をack独色したところ多くの個体でack遺伝子の ると考えられた。形質転換植物の得られる頻度は特に呼 ゲ(GE-)個体が少なく、再分化時のPFI終恒による道 る。次に接種からカルス増殖まで同じ条件で培費、選抜 されたPVI抵抗性カルスを通過度(20mg 1)のPVIを含む し、 再分化した植物体のQuSAR以と調査したところPPTを カルスが符られた (表4、8)。 これらのカルスをハイ したところ商率で植物体の再分化がみられた。再生した **く常に供試した未熱胚の10%以上のものから独立の形質** 転換植物が得られた(表8)。 このことは本法が安定し て高知度で形型転換がなされる方法であることを示唆す 含む拾塩で用分化した植物体ではキメラ個体やエスケー Rの11~22%、PT競技では回じへ35~62%かの抵抗権 用分化倍地とPPTを含まない用分化倍地にそれぞれ関係 グロレイツンまたはPPFを包む値物体
は分化性的に関係 発現が認められ(表5,6)、これらは形質低換値物であ TC遊抜を行った場合に高く、また実験間での恐も少な

坂効果が確認された(表7)。

AACATIG - 3′ )を用いたPCRを実施した。1.8A4404 (pTO

O.32)を鋳型とした場合0.8kbの増幅断片が検出された が、抵抗性カルスおよびアグロバクテリウム非脳染カル

(13)

特許3329819

4 ハイグロマイシン選抜によるトウモロコシ未熟胚の形質転換効率

英級	ハイグロマイシン 遊抜経過(mg 1)	ハイグロマイシン 抵抗性カルス数 / 供試未熟胚数 (%)
	0-30- 50	5 22(23)
2	0-30- 50	6 22(27)
<sub>د</sub>	0-30-100	2 19(11)

ハイグロマイシン選抜は共存培養後、各磺度で2 ~3 週間ずつ培養した。

**扱う ハイグロマイシン選抜による形質転換植物体の選抜効率** 

聚聚	ハイグロマイシン 抵抗性カルス数	植物体 再生カルス数	G U S + 植物体数
-	64	п	10
2	15	<b>∞</b>	1-
က	20	က	2

表 6 PPT 選抜による形質転換効率

聚聚	供試未熟胚数	增殖 未熟胚数(\$)	再分化未熟胚数(%)	GUS+ 植物体数(s)
_	364	200(55)	71(20)	44(12)
2	121	42(35)	31(26)	20(17)
c.	89	28(41)	17(25)	9(13)
4	4	.28(64)	6(20)	6(14)

各欄の未熟胚数および植物体数はクローンを含まない数

(14)

特許3329818

表 7 再分化结地中へのPPT 添加が再分化効率および形質転換効率に及ぼす影響

<b>入色率(%)</b>	-Sno	6   27
ko c u s s	キメラ	17
再分化植物体のGUS染色率(%)	- SNO	74
H	井が元 カルス数(%)	335(47) 184(53)
‡ *	まりカルス数	714
	PPT 液挡	+ 1

PPT添加濃度 +:20 mg l, -: 0 mg l

(15) トウモロコン形質転換当代における導入遺伝子のよった。

形質を後体の全DNをBam1で切断した部片に対してbarもよびGNS遺伝子をフロープとしたサザン法により形質 気後当代における導入遺伝子の役組を行った。いずれの 遺伝子をプロープとした場合でも供戴した全ての個体で 1、数コピーの導入遺伝子の存在が認められた(表 8)。プラスミドpS131の中ではban遺伝子を含むBam1 断片は2.78。GNS131の中ではban遺伝子を含むBam1

に対し供抗した全ての形質が設体には約344以上のパンドが窓められた。このことはbar、GSの両道伝子とも値20 物染色体に組み込まれたことを裏付けるものである。また検出されたGW断行の及さは出来の違う個体では全て異なった。これはトウモロコンの染色体への遺伝子導入 国所がそれぞれ異なることを示すものであり、植物体内でのパクテリアの残存によるものではない。植物体内でのパクテリアの残存によるものではないことが確認された。

(15)

特許3329819

8

29 表8 サザン解析による形質転換当代における

導入遺伝子のコピー数

	·	1													
こっぱー数	s n s	i i	5			~		-	2	_	-	61	-	-	-
導入遺伝子コピー数	Ьаг	1	2	2	3	5	2	2	2	ဇ	6	2	,	-	-
五百五十二十二十二十二十二十二十二十二十二十二十二十二十二十二十二十二十二十二十	万里特敦商子(出代)	対照	転換体 ]	2 a	2 P	က	ę.	d 4.	S	ç	1	œ	e O	9 b	1 0

(16) PIOK233を導入したトウモロコンの次世代における導入遺伝子の発及と分析 ハイグロマインンによる遺抜後得られた形質転換値物

と非形質転換植物を交配して仰られた次世代植物の既を GNS集色したところGNSW程と降性の比は、ほば1:12の 館し予想された分離比に適合した(表9)。

(16)

**特許3329819** 

8

表9 ハイグロマイシン選抜によるトウモロコシ

ᆏ

形質転換個体の次世代における導入遺伝子の発現

a体数	GUS発現	操性	2	22	9
次世代個体数	3 N S	陽性	0	4	S.
	形質転換個体		湖族	転換体 1 1	1.2

(17) pSB131を導入したトウモロコシの次世代における 導入遺伝子の発現

対照品種の葉をは5次色したところ全て特性であった のに対し、形質転換値物を自殖して得られた次世代の葉 は1個体を除き全て陽性を示した。さらにこれらの植物 体にバスタを途布したところ対照品種の葉は約2週間で 全て枯死したが形質転換次世代の薬はなは熔性を示した 個体を除き全て縫合であった(表110)。な5遺伝子の発 現、PPT抵抗性ともに2因子分離に適合する遺伝的分離

R

を示した。次に対照品様より採収した未熟胚をPPT含有 培地で培養したところ全ての未熟胚が増殖を抑制されか ルス誘導はみられなかった。これに対し形質転換植物と 非形質転換値物を交配して得られた次世代値物から採取 した未熟胚では供試した何系統とも置床した未熟胚の的 50%からカルスが誘導され、その後同倍地上で旺盛な増 殖を示した(表11)。これらの増殖したカルスを包貸 色したところいずれのカルスでも全体が特色に最色は

3

特許3329819

表10.PPT選抜によるトウモロコシ形質転換個体の次世代における

導入遺伝子の発現(幼苗での検定)

	GUS	额	2.0	-
数	19	革	0	9
次世代個体数	抗性	感受性	5.0	7
	PPT框抗性	抵抗性	0	4 9
	45	GUS 抵抗性	ı	2
	コピー数	bar	ı	2
	-	形質転換個体	超	転換体21

次世代における導入遺伝子の発現 (未熱胚による検定) P P T 選抜によるトウモロコシ形質転換個体の 表1.

<b>次世代未熟胚数</b>	玩性	感受性	9 2	3 2	2 5
次世代为	PPT抵抗性	抵抗性	0	2 9	2 2
	形質転換個体		対照	転換体3.1	3 8

(18) pSB131を導入したトウモロコシの次世代における 導入遺伝子のサザン解析

表10K示した形質転換個体No.21を自殖して得られた

ての個体でいずれの遺伝子をプローブとした場合でも導 在による導入遺伝子の検出を行った。植物体でのGDS遺伝子の発現が特性、PTIの受性であった個体を除き、全 次世代植物からDMを抽出し前述と回様の方法でサザン

8

致し、またそれぞれのパンドの長さは形質航後当代の個体のものものと同一であった。以上の結果から本法によりア 伝子が植物の細胞の核に組み込まれメンデルの遺伝に従 入遺伝子の存在が認められた(表12)。 導入遺伝子の存 グロバクテリウムを用いてトウモロコシに導入された遺 在が認められた個体はいずれもbar、QuSのコピー数が一 って安定して役代に遺伝することが確認された。

(18)

特許3329819

サザン解析による形質転換次世代における 35 表12

導入遺伝子のコピー数

\*特にスーパーパイナリーベクターを有する関系であるLB M404 (pigc22) を用いた場合に顕著に高い効率でGS 遺伝子の発用が超められた (炎13)。 未熱胚においても高率でGIS遺伝子の発現が認められ、\* トウモロコシ未熟胚を材料としたときと同様に、イネ (19) イネ米熱胚への接種

イネ未熟胚へのGUS遺伝子導入効率 表 1 3

で C U S + の組	無処理 0 /	EHA101(p1G121Hm) 66/198	LBA4404(pT0K232) 5 2 /	
GUS+の組織数/処理組織数	50 (0)	198 (33)	52 (100)	
(%)				

この実験で使用した2種類のバイナリーベクターはア SO グロバクテリウムの細胞の中ではQS通伝子は発現しな

特許3329819

(20

(ET)

いことから、共存倍致後のGK遺伝子を指揮とした場合、アグロバクテリウムはドウモロコンおよびイネの細胞に遺伝達を予入できることが確認された。 (20) イネ形質応援が体の選接

イネ未然版において、50mg 1ハイグロマイシン添加時間上で低价性カルスの選抜を行ったところ、スーパーバイナリーペクターを有する選系を用いた場合に、顕著にないの第で独信性カルスが得られた(表14)。これらは、選抜マーカーを含む植物体再生培地に移植することにより、容易に再生植物体が得られた(表14)。また、10年生植物の葉におけるの5条現を調査したところ、いず、本

表14 イネ未熟胚における形質転換体の選抜結果

 \*\* れの個体においてGX遺伝子の発現が認められ、形質能、 没値物であると考えられた。アグロバクテリウムの箇条 HW101 (pIGIZIIM) は、強腐原性のpi180542のグィルレンス環境を有するものの、スーパーパイナリーペクター と行ていない。Gmaらが用いた個条を同様な過程で超級が率し が一パ り、本実施物の結果と同様に非常に低い形質転換が率し が得たれていない、Gma M. Tet al.,1993/Plant Mol. B 101、22:491-506)。これに対し、スーパーパイナリー くクターを有する菌系を用いることにより、飛躍的にに たた、10 減い効果でイネ未熟胚の手限電機機が得られることとにより、飛躍的にと いす、\*\* か本実施剤において明かとなった。

供試 抵抗性 植物体再生 薬剤     表熱胚 カルス カルス カルス カルス カルス     無処理   40 0(0) 0(0)			組織数 (%)		#
理 40 0(0) 0(0) 0(0) 0(1) 17(22) 17(22)		無	抵抗性	植物体再生	楽
(pIGI21Hm) 71 3 (4) 1 (1) (4pok232) 77 23 (30) 17 (22)	米里	未熟胚	カルス	カルス	
71 3 (4) 1 (1) 77 23 (30) 17 (22)	無処理	4 0	(0 ) 0	(0 ) 0	HYG
77 23 (30) 17 (22)	EHA101(p[G121Hm)	7 1	÷	1 ( 1)	HYG
	LBA4404(pT0K232)	1.1	23 (30)	17 (22)	HYG

HVG :ハイグロマイツン

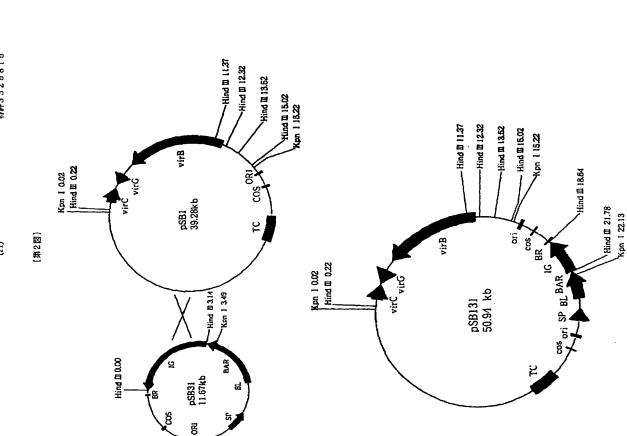
(21) イネ形型配換個体における導入通伝子の確認 LRA404 (pTCA232) をイネ未熱低化処理することによ り得られた任意かつ独立な形質転換植物3 個体につい て、導入遺伝子の存在を複製建模ので、「CA2)を大きままます。 構造関域の両端を用いた。対照として非形質転換体のIN 株立関域の両端を用いた。対照として非形質転換体のIN なよび各遺伝子を有するプラスド FUNを用いた。その おいての名は、大部の(22)を処理することにより得られ た形質能像化、対照のプラスドでおけるのと同様 に、3個体とも中心遺伝子の1.14かの増幅断片が検出された。 方はた、また、Gに遺伝子についてもすべての個体で対照プラスミドと同様の1.84か的増配片が検出された。また、Gに遺伝子についてもすべての個体で対照プラスミドと同様の1.84か的増脂片が検出された。非形

質症後体ではこれらの断片は検出されなかったことから、供食値物体はアグロパクテリウムにより導入された 通伝子を有する形質転換値物体であることが確認され

産業上の利用可能性

上述のように、本発明の方法は、従来の方法に比較して、形質を換から植物体の再生までの時間が短く、プロトプラストからの植物体の再生が確立されていない植物のだけても普通がに適用することができ、特殊な装置を必要とせず、さらに用いる材料の顕数が容易な単子業植物の形質転換方法であるので、本発明は、有用な性質を有する単子業植物の育種に利用可能である。





レロントページの概率

\*

照定

寄査官

(So) 金沙文献 特明 平4 - 222527 (JP, A)
Plant Mol. Biol., V
ol. 22, No. 3 (1993.) p. 491
- 506
Plant Cell, Vol. 4,
No. 1 (1992) p. 7-16
Plant Cell, Tissue
and Organ Cultur
e, Vol. 25, No. 3 (19
Plant Cell, Vol. 4,
No. 12 (1992) p. 1495-1505

(38)関産した分野 (Int. CI.', DB名) ADIH 1/00 CI2N 15/84 BIOSIS/WPI(DIALOG) CA (STN)